

Análisis de polimorfismo de nucleótido simple en el gen *FASN* y su relación con características de producción en pollos

MARRUBE, G.¹; ROZEN, F.M.B.¹; PINTO, G.B.¹; FASSA, V.¹; PACIENZA, N.¹; DEMARCO, A.N.¹; ROMANO, E.G.¹; FAIN BINDA, V.²; CANET, Z.²; MELO, J.E.¹

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es evaluar la posible asociación entre un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) del gen *FASN* y cada uno de los siguientes caracteres productivos: Consumo de Alimento (CA), Ganancia de Peso (GP) y Peso Vivo Final (PVF). Durante la experiencia en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), se organizaron y criaron 229 pollos de familias de hermanos enteros y de medios hermanos paternos. Cada una de las aves fue alojada en jaulas individuales con agua y alimentada con pellet ad libitum. El peso corporal se registró a los 54 días de edad y luego se determinó semanalmente y en forma individual el consumo de alimento y el peso durante 21 días. Los genotipos del gen *FASN* fueron identificados por amplificación por PCR y digeridos por la endonucleasa *Hae* III. La información fenotípica fue analizada en forma independiente por ANOVA con un modelo aleatorio. No se ha demostrado que los SNP evaluados en este trabajo afecten los caracteres analizados.

Palabras clave: pollos parrilleros, caracteres productivos, polimorfismo del gen *FASN*.

ABSTRACT

The purpose of this work is to evaluate possible associations between a Single Nucleotide Polymorphism (SNP) of FASN gene and each of the following productive traits: Feed Intake (FI), Weight Gain (WG) and Final Body Weight (FBW). At the National Institute of Agricultural Technology (INTA), 229 chickens were organized and bred in full sib and paternal half sib families, these birds were caged individually with water and fed with pellet ad libitum. Body weight was recorded at 54 days old and then individual feed intake and weight were determined weekly during 21 days. FASN gene genotypes were identified by PCR amplification and digested by endonuclease Hae III. Phenotypical data were analyzed independently by ANOVA with a random Model. The SNP evaluated in this work has not been demonstrated as affecting the considered traits.

Keywords: broilers, productive traits, *FASN* gene polymorphism.

¹Departamento de genética, Facultad de Veterinaria. Universidad de Buenos Aires. Av. Chorroarín 280, CP 1427, Buenos Aires, Argentina.

²Sección Avicultura, EEA-INTA Pergamino, Buenos Aires, Argentina. Correo electrónico: marrube@fvet.uba.ar

INTRODUCCIÓN

Las líneas comerciales de pollos parrilleros son el resultado de una selección intensiva para obtener animales de rápido crecimiento, magros y con mayor masa muscular. Estos caracteres, que revisten una importancia económica, están asociados con el aumento de la ingesta voluntaria lo que lleva a aves que no regulan adecuadamente el consumo en relación al balance energético. Estos animales presentan entonces obesidad como consecuencia de la hiperfagia cuando tienen libre acceso al alimento (Richards *et al.*, 2003).

El gen *FASN* codifica para la enzima sintasa de ácidos grasos (*FASN*) que cataliza el último paso en la biosíntesis de ácidos grasos y cumple un papel relevante en la variabilidad del peso de los tejidos adiposos del organismo. Didri *et al.* (2006), demostraron que la expresión hipotalámica de *FASN* se reducía con el status alimenticio, lo que sugiere que la enzima puede estar implicada en el control del apetito y saciedad a nivel cerebral en pollos. En los últimos años, las técnicas moleculares se han convertido en una herramienta importante en la mejora genética de los animales cuando las mutaciones específicas en genes funcionales se asocian con la variación fenotípica.

En la Estación Experimental Pergamino del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), en Buenos Aires, se conducen programas para obtener animales magros y de crecimiento lento, llamados Campero INTA (free-range). Estos pollos de lento crecimiento son criados en un sistema productivo semi-intensivo y son sacrificados a los 81 días de edad (Sauveur, 1997). Este trabajo incluye un proyecto global de selección de pollos parrilleros Campero INTA así como la utilización de un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) a ser aplicado en un esquema de selección asistida por genotipos (SAG). El objetivo de este trabajo fue evaluar la posible asociación de un SNP del gen candidato *FASN* en relación con los siguientes caracteres productivos: Consumo de Alimento (CA), Ganancia de Peso (GP) y Peso Vivo Final (PVF).

MATERIALES Y MÉTODOS

El Campero es un pollo parrillero obtenido de la cruce de líneas reproductoras de engorde maternas y paternas. La línea materna es originaria de un cruzamiento entre las líneas Cornish Red y Rhode Island Red. La línea paterna se originó a partir de un cruzamiento entre Plymouth Rock Red, introducido en la Argentina en la década de 1960 y otra línea Plymouth Rock Red recientemente incorporada. Ambas líneas se reproducen en cada generación usando 15 machos y 150 hembras.

Para la selección de ejemplares en esta población original se excluyeron las aves sin plumaje de color, con defectos sanitarios y de bajo peso vivo. La experiencia se llevó a cabo en la Estación Experimental INTA Pergamino y se utilizaron 229 pollos (99 machos y 130 hembras) pertene-

cientes a la línea paterna. Los animales fueron organizados en familias de hermanos enteros y de medio hermanos paternos: 16 padres (entre 7 y 32 hijos) y 55 madres (entre 3 y 15 hijos). Los caracteres analizados fueron: Consumo de Alimento (CA, g), Ganancia de Peso (GP, g) y Peso Vivo Final (PVF, g). El peso corporal se registró a los 54 días de edad.

Las aves fueron alojados en jaulas individuales con agua y alimento tipo pellet *ad libitum*, cuya composición fue: Energía Metabolizable (EM): 2890 Kcal; Proteínas: 160g/kg; Lisina: 8 g/kg; Metionina + Cisteína: 6,4 g/kg; Calcio: 12 g/kg; Fósforo: 3,7 g/kg. Inicialmente se administraron 700 g de la comida tipo pellet y semanalmente se agregaban 500 g. de pellet en cada jaula después de pesar la cantidad de comida remanente en el comedero. El consumo de alimento individual y el peso de las aves se determinaron en forma semanal durante 21 días.

El ADN se aisló a partir de muestras de sangre entera con Papel Nucleico (B161-5, Biodynamics SRL). Los genotipos fueron determinados por PCR-RFLP (Marrube *et al.*, 2004). Condiciones de PCR: la amplificación se llevó a cabo en 20 µl conteniendo 10 pmoles de cada cebador, 2 U de Taq polimerasa (Promega®) con su correspondiente buffer, 2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de Cl_2Mg y 50 ng de ADN genómico. El ADN se desnaturalizó durante 4 m a 64°C, y se realizó la PCR durante 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, 61 °C 30 s para la hibridación, y la extensión fue a 72 °C durante 90 s. El producto amplificado fue de 1425 pb. Secuencias de los cebadores: *FASN Directo* 5'GCT-GAAGGCTGCTGACAAGTA 3' *FASN Reverso*: 5'AACAC-CATCTCCCTCCAATAAG 3'.

Los productos de PCR fueron secuenciados en un secuenciador automático ABI373 y la sustitución G/A se localiza en la base 459 del producto de PCR (y en la base 1222 de GeneBank J02839), resultando en un sitio que fue reconocido por la enzima de restricción *Hae* III. Condiciones de restricción: en una reacción de 20 µl, 160 ng de los productos de PCR fueron digeridos con 1U de *Hae* III con el buffer suministrado por el fabricante (New England Biolab®). Después de 60 minutos de incubación a 37 °C los fragmentos se resolvieron en un gel de agarosa al 3%: El Alelo A fue de 780 + 340 + 305 pb y el alelo G de 780 + 340 + 240 + 65 pb.

Los datos fenotípicos fueron analizados independientemente por ANOVA (INFOSTAT versión 2006d I) de acuerdo con el siguiente modelo aleatorio: $Y_{ijklmn} = \mu + T_i + S_j + S_k + DS_l + G_m + (SX^*S)_{jk} + (SX^*G)_{jm} + (SX^*DS)_{jl} + (G^*S)_{mk} + (G^*DS)_{ml} + (G^*SX^*DS)_{mjl} + e_{ijklmn}$, donde: Y_{ijklmn} : es la característica medida en el individuo i (CA; GP; PVF); μ : media general para el carácter; T_i : efecto de la prueba (correspondiente a dos años consecutivos); SX_j : efecto del sexo del ave; S_k : efecto del padre; G_m : efecto del genotipo del ave; DS_l : efecto de madre dentro de padre; $(SX^*S)_{jk}$: interacción entre el sexo del ave j-esimo y el padre k-esimo; $(SX^*G)_{jm}$: interacción entre el sexo del ave j-esimo y el genotipo m-esimo; $(SX^*DS)_{jl}$: interacción entre el sexo del ave j-esimo y el efecto de madre D y el k-esimo padre S; $(G^*S)_{mk}$: interacción

entre el genotipo m-esimo y el padre k-esimo; $(G*DS)_{mk}$: interacción entre el genotipo m-esimo y el efecto madre dentro del padre l-esimo; $(G*SX*DS)_{mjl}$: interacción entre el genotipo m-esimo, el sexo del ave j-esimo y el efecto madre dentro del padre + e_{ijklmn} : error residual. Dado que el modelo es desbalanceado, las medias fueron corregidas usando el método de mínimos cuadrados (LSMEANS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La descripción estadística asociada a los caracteres analizados con el modelo son descriptos en la tabla 1. La diferencia en la variabilidad entre CA (CV 15,2%) y GP (CV 29,2%) indicaría que son posibles cambios considerables en GP sin variaciones importantes en CA (tabla 1).

La frecuencia génica fue 0,39 para el alelo A y 0,61 para el alelo G. En la tabla 2 se pueden observar las frecuencias genotípicas, media fenotípica, error estándar, valores F y p para los tres caracteres analizados. Para estos tres caracteres no se hallaron diferencias significativas entre los tres genotipos.

Se registraron diferencias significativas para Peso Vivo Final según el efecto del sexo del ave ($p < 0.002$) y según la interacción del genotipo por padre ($p < 0.05$). Dicha interacción ($G*S$), sugiere que existe variabilidad entre ($G*S$) en relación al Peso Vivo Final de los hijos.

En lo que respecta a la ganancia de peso se registraron diferencias significativas para la interacción sexo por genotipo ($p < 0.002$). En nuestro caso los animales con genotipo CG ganaron más peso en ambos sexos en comparación con CC y GG. Finalmente, para el análisis de consumo de alimento, no se registraron diferencias significativas para ninguno de los efectos considerados.

En un screen genómico realizado en cruza F2 generados a partir de una línea macho de pollos parrilleros y dos líneas puras genéticamente distintas (Leghorn y Fayoumi), Zhou *et al.* (2006) detectaron la presencia de Loci de Caracteres Cuantitativos (QTL) para peso corporal (PC) a las ocho semanas y ganancia diaria entre la cuarta y sexta semana, en el cromosoma 18 (GGA18), en una región de ADN cerca de la posición en la que se encuentra el gen *FASN*. Ambo *et al.* (2009), detectaron un QTL que afecta el PC al nacer y el PC a los 35 días en una región análoga de GGA18 en un escaneo genómico en una población brasileña de pollos parrilleros F2 y una cruce.

Leenstra y Pozo (1987), sugirieron que la ganancia de peso está relacionada de manera positiva con un mayor apetito. Esto también se explica como una disminución en el mecanismo de saciedad que genera una diferencia en el consumo constante durante las 24 horas del día (Dunnington; 1990).

Loftus *et al.* (2008), identificaron una relación entre el metabolismo anabólico energético y el control del apetito. Los tratamientos sistémicos de ratones con inhibidores de *FASN* resultaron en disminución del apetito y pérdida de peso. Según estos autores, *FASN* puede representar un eslabón importante en la regulación del consumo de alimento. Por lo tanto el motivo para estudiar la Tasa de Conversión de Alimento y sus componentes se encuentra en el hecho que en las líneas de pollos con una tasa alta de crecimiento, la regulación de la ingesta sería diferente en comparación con aquellos animales de crecimiento lento, como en el caso de los pollos Campero INTA. Didri *et al.* (2006), demostraron que la expresión hepática de *FASN* fue mayor en las líneas de pollos grandes o pesados que en aquellos más livianos. Ordovas *et al.* (2008), demostraron que *FASN* está aumentado transcripcionalmente. El SNP g.841 G> C del gen bovino *FASN* afecta a la actividad

Caracteres	Media fenotípica	Desviación estándar	Coefficiente de variación (CV %)	R ²
Ganacia de peso (g)	686	201	29.3	0.61
Peso vivo final (g)	2173	237	10.89	0.76
Consumo de alimento (g)	2953	448	15.2	0.61

Tabla 1. Media Fenotípica, Desviación estándar, Coeficiente de Variación (%) y el Coeficiente de Determinación (R²) para los caracteres

	Genotipo AA	Genotipo AG	Genotipo GG	F	p-valor
Frecuencias genotípicas	0.15	0.48	0.37		
Ganacia de peso (g)	690 ± 35	708 ± 22	659 ± 22	1.73	0.37
Peso vivo final (g)	2139 ± 54	2212 ± 34	2141 ± 32	1.06	0.2
Consumo de alimento (g)	2830 ± 93	2957 ± 45	2999 ± 52	0.53	0.6

Tabla 2. Frecuencias Genotípicas, Media Fenotípica y Error Estándar para los tres caracteres analizados por genotipo y p-valor

del promotor a través de la regulación mediada por Sp. Los resultados demostraron que estos SNP alteran la actividad del promotor de *FASN* bovino *in vitro* y la capacidad de unión Sp1/Sp3 a la secuencia.

No se encontraron diferencias significativas para PVF y CA, lo que indica que la variabilidad de PVF asociada con el genotipo *FASN* en nuestro ensayo se explicaría por otros mecanismos diferentes al CA.

CONCLUSIÓN

En base a la ubicación y su función, el gen *FASN* es un buen candidato en un esquema de Selección Asistida por Genotipos, pero el SNP evaluado en este trabajo no ha demostrado afectar los caracteres analizados. Son necesarios los análisis adicionales para determinar si el efecto del genotipo *FASN* puede ser estudiado en diferentes líneas de pollos. Debido a la evidencia encontrada en otras especies las regiones regulatoria no traducida 5' y 3' (UTR) deben ser analizados en el gen *FASN* de los pollos parrilleros para buscar polimorfismos funcionales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a la Ingeniera Agrónoma Dra. María Cristina Miquel por dirigir este proyecto. La investigación contó con el apoyo del proyecto UBACyT TV 25 2004-2007.

BIBLIOGRAFÍA

- AMBO, M.; MOURA, A.S.A.M.T.; LEDUR, M.C.; PINTO, L.F.B.; BARON, E.E.; RUY, D.C.; NONES, K.; CAMPOS, R.L.R.; BOSCHIERO, C.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. 2009. Quantitative trait loci for performance traits in a broiler x layer cross. *Animal Genetics*. (40): 200-208.
- DIDRI, S.; VERVEKEN, C.; HILLGARTNER, F.B.; LUTGARDE, A.; VAN DER GUCHT, E.; CNOPS, L.; DECUYPERE, D.; BUYSE, J. 2006. FAS inhibitor cerulenin reduces feed intake and melanocortin receptor gene expression without modulating the other (an) orexigenic neuropeptides in chickens. *American Journal of Physiology* (291): 138-147.
- DUNNINGTON, E. 1990. Selection and homeostasis. *Proceedings of the 4th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Edinburgh (16): 21-30.
- INFOSTAT Versión 2006d I Program (www.infostat.com.ar)
- LEENSTRA, F.; PIT, R. 1987. Fat deposition in a broiler sire strain in a comparison among lines selected for less abdominal fat, lower Feed Conversion Ratio and higher Body Weight after restricted and *ad-libitum* feeding. *Poultry Science*. (66): 193-292.
- LOFTUS, T.M.; JAWORSKY, D.E.; FREHYWOT, G.L.; TOWNSED, C.A.; RONNETT, G.V.; LANE, M.D.; KUHAJDA, F.P. 2008. Reduce Food Intake and Weight in mice treated with acid synthase inhibitors. *Science* 288: 2379 -2381.
- MARRUBE, G.; ROZEN, F.M.B.; PINTO, G.B.; PACIENZA, N.; MELO, J.E.; HUGUET, M.J.; CANET, Z.; ZANDOMENI, R.; MIQUEL, M.C. 2004. New polymorphism of *FASN* gene in chicken. *Journal of Applied Genetics*. 45 (4): 453-455.
- ORDOVÁS, L.; ROY, R.; PAMPÍN, S.; ZARAGOZA, P.; OSTA, R.; RODRIGUEZ-REY, C.; RODELLAR, C. (2008). The g.763G>C SNP of the bovine *FASN* gene affects its promoter activity via Sp-mediated regulation: implications for the bovine lactating mammary gland. *Physiol Genomics*; 34: 144-148
- PITEL, F.; FILLON, V.; HEIMEL, C.; LE FUR, N.; EL KHADIR MOUNIER, C.; DOUAIRE, M.; GELLIN, J.; VIGNAL, A. 1998. Mapping of *FASN* and *ACACA* on two chicken microchromosomes disrupts the human 17q syntenic group well conserved in mammals. *Mammalian Genomics* (9): 297 300.
- RICHARDS, M.P.; POCH, S.M.; COON, C.N.; ROSEBROUGH, R.W.; ASHWELL, C.M.; MCMURTRY, J.P. 2003. Feed restriction significantly alters lipogenic gene expression in broiler breeder chickens. *Journal Nutrition*. 133 (3): 707-715.
- SAUVEUR, B. 1997. Les critères et facteurs de la qualité des poulets Label Rouge. *Animal Production* (10): 219-226.
- ZHOU, H.; DEEB, N.; EVOCK-CLOVER, C.M.; ASHWELL, C.M.; LAMONT, S.J. 2006. Genome-Wide linkage analysis to identify chromosomal regions affecting phenotype traits in the chicken I. Growth and Average Daily Gain. *Poultry Science*. (85): 1700-1711.